

POWERED BY **Dialog****Adsorbent and adsorption appts. - for saccharide contg. substances in blood****Patent Assignee: ASAHI CHEM IND CO LTD****Patent Family (1 patent, 1 country)**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
JP 60163667	A	19850826	JP 198419376	A	19840207	198540	B

Priority Application Number (Number Kind Date): JP 198419376 A 19840207**Patent Details**

Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
JP 60163667	A	JA	6	1	

Alerting Abstract: JP A

Adsorbent (I) comprises an insoluble support to which a peptide having a sugar chain and an affinity are bonded. Appts. for adsorbing saccharides-containing substances in blood comprises a vessel which has an inlet and an outlet for a fluid and contains (I).

USE/ADVANTAGE - Useful for purifying substances such as glycoproteins, saccharides, glycolipids, etc., which are considered to relate closely to various symptoms, from the body fluids. Useful for purifying the blood, serum, etc., partic. in treatment of malignancy, blood diseases, etc..

International Classification (Additional/Secondary): A61M-001/36, B01J-020/24**Original Publication Data by Authority****Japan**

Publication Number: JP 60163667 A (Update 198540 B)

Publication Date: 19850826

Assignee: ASAHI CHEM IND CO LTD (ASAH)

Language: JA (6 pages, 1 drawings)

Application: JP 198419376 A 19840207 (Local application)

Original IPC: A61M-1/36 B01J-20/24

Current IPC: A61M-1/36 B01J-20/24

Derwent World Patents Index

© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 3472557

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-163667

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)8月26日

A 61 M 1/36
B 01 J 20/24

6675-4C
7106-4G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 血液中の糖含有物質の吸着材および吸着装置

⑯ 特 願 昭59-19376

⑰ 出 願 昭59(1984)2月7日

⑱ 発 明 者 山 田 公 政 富士市蛟島2番地の1 旭化成工業株式会社内

⑲ 発 明 者 山 脇 直 邦 富士市蛟島2番地の1 旭化成工業株式会社内

⑳ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

㉑ 代 理 人 弁理士 清 水 猛

明 細 書

1 発明の名称

血液中の糖含有物質の吸着材および吸着装置

2 特許請求の範囲

(1) 不溶性担体に、糖鎖とアフィニティーを有するペプチドが結合していることを特徴とする血液中の糖含有物質の吸着材。

(2) 流体の導出入口を有する容器内に、糖鎖とアフィニティーを有するペプチドが結合している吸着材が収容されていることを特徴とする血液中の糖含有物質の吸着装置。

3 発明の詳細な説明

本発明は、各種病態と密接な関係をもつと考えられている糖、糖タンパク質、脂質等の糖含有物質を体液中より吸着浄化する体液浄化用吸着材およびその吸着装置に関する。

近年、糖質化学、複合糖質化学の進歩によつて、血液中の糖含有物質が重要な生体機能を担っていることが明らかになりつつある。特に炎症時の急性相反応物質、免疫抑制物質等は、炎症、癌性腫

瘍等の原因、進行等と密接な関係を持ち、血液中より吸着除去し、上記の如き疾患の進行を防止し、症状を軽減せしめ、さらに治癒を早めることが期待されていた。

従来、このような目的に対し、血漿交換療法が施療され、増加した糖含有物質を非特異的に除去することが試みられている。しかし、交換補液の確保や肝炎ウイルス感染のリスクがあり、広く普及するには制約がある。また、ポアサイズを制御したガラスビーズを用いて吸着浄化することも試みられているが、吸着能力が低く、目的物以外のものも非特異的に吸着し、さらには凝固因子を活性化する等の欠点を有している。さらに、植物の種子や動物の肝細胞等より抽出され、糖含有物質と特異的にアフィニティーを有するタンパク質または糖タンパク質であるレクチンを不溶化した吸着材は、目的物を特異的に吸着できるが、レクチンは一般的に高分子の異種タンパク質であり、強い抗原性を有することから、不溶化したレクチンの溶出に伴うかかる異種タンパクの体内移入の

懸念を有する。

本発明は、上記のような従来技術に基づく問題点に鑑み、吸着能力と吸着選択性が高く、安全な糖タンパク質・脂質吸着材およびその吸着装置を提供せんとするものである。

本発明者らは、上記目的に沿って鋭意研究した結果、糖鎖とアフィニティーを有するペプチドを不溶性担体に結合させた吸着材をヒト血漿と接触させたところ、驚くべきことに、血漿中の糖タンパク質を吸着除去することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、不溶性担体に糖鎖とアフィニティーを有するペプチドが結合していることを特徴とする血液中の糖含有物質の吸着材、さらに、該吸着材が流体の導出入口を有する容器に收容されていることを特徴とする吸着装置である。

本発明で対象とする目的物質は、体液中に存在または混入する糖タンパク質、ムコ多糖、リボ多糖、ペプチドグリカン、その代謝生成物および糖含有複合体等の糖含有物質である。免疫疾患における免疫グ

ロブリン、免疫グロブリンL鎖、免疫複合体、血液疾患におけるヘモグロビン、トランスフェリン、フィブリノーゲン、プロトロンビン等の糖タンパク質、悪性腫瘍における α -フェトプロテイン、カルシノエンブリオニクアンティゲン(CEA)等のガン胎児性糖タンパク、 α_1 -アツドグリコプロテイン、 α_2 -マクログロブリン、 α_1 -アンтитリブシン等の免疫抑制性糖タンパク、炎症におけるC反応性タンパク、結石における硫酸化糖タンパク、タム-フオスファル(Tamm-Horsfall)糖タンパク、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン等のムコ多糖、リビッドA等のリボ多糖、細菌細胞壁のペプチドグリカン等を例示することができる。

本発明において糖鎖認識ペプチドとは、単糖またはオリゴ糖と水素結合を形成することができるアミノ酸残基を分子中に30%以上、好ましくは50%以上、特に好ましくは70%以上含有するペプチドである。すなわち、側鎖にカルボキシル基、アミノ基、水酸基および芳香環、複素環を有

するアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、リジン、アルギニン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン等の水素結合供与基や受容基を有するアミノ酸残基を前記含有率で含むペプチドである。

また、ペプチドの分子量としては、アミノ酸で3残基以上50残基で分子量1万以下、好ましくは3残基以上20残基以下である。これにより、当該物質が不溶性担体から溶出した場合にも、分子量1万以下であれば、生体に対する抗原性が無視できるほど小さく安全であり、さらに好ましくは分子量4000以下であり、特に好ましくは分子量2000以下である。

具体的には、フェニルアラニル-セリル-トレオニル-セリル-トレオニル-リジン(Phe-Ser-Thr-Ser-Thr-Lys)、リジル-トレオニル-セリル-グルタミル-トレオニン(Lys-Thr-Ser-Gln-Thr)、チロシル-プロリル-アスパラギル-トレオニル-アスパラギン酸(Tyr-

Pro-Asn-Thr-Asp)等のジャックビーンレクチンの糖鎖結合に関与していると報告されている(Biochem. 15, 1120, 1976)アミノ酸残基を含むペプチド、およびアラニル-プロニル-トレオニル-セリル-セリル-セリル-トレオニル-リジル-リジル-トレオニン(Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-Lys-Thr)等のヒト・インターロイキン2のシグナルペプチドを除いたN末端から10残基のペプチド(Nature, 302, 305, 1983)などを例示することができる。

本発明で用いられる不溶性担体は、親水性担体、疎水性担体いずれも使用できるが、疎水性担体を用いる場合には、時に担体へのアルブミンの非特異的吸着が生じる場合があるため、親水性担体の方が好ましい結果を与える。

不溶性担体の形状は、粒子状、繊維状、中空糸状、膜状等いずれの公知の形状も用いることができるが、糖鎖認識ペプチドの保持量、吸着材としての取扱性よりみて、粒子状のものが好ましい。

粒子状担体としては、平均粒径 25μ ないし 3000μ の範囲にあることが好ましく、より好ましくは 50μ ないし 1500μ の範囲である。平均粒径はJIS-Z-8801に規定されるフルイを用いて流水中で分級した後、各級の上限粒径と下限粒径の中間値を各級の粒径とし、その重量平均として平均粒径を算出する。また、粒子形状は球形が好ましいが、特に限定されるものではない。平均粒径が 3000μ 以上では、糖含有化合物の吸着量および吸着速度が低下するし、 25μ 以下では、圧損失が大きく通常の条件で通液しにくい。使用できる粒子状担体としては、アガロース系、デキストラン系、セルロース系、ポリアクリルアミド系、ガラス系、シリカ系、活性炭系の担体であるが、ゲル構造を有する親水性担体が良い結果を与える。また、通常固定化酵素、アフィニティクロマトグラフィーに用いられる公知の担体は、特別な限定なく使用することができる。

また、粒子状担体としては、多孔性粒子、特に多孔性重合体を用いることもできる。本発明で用

いられる多孔性重合体粒子は、その表面に糖鎖認識ペプチドを固定化できるものであり、平均孔径 300\AA ないし 9000\AA の範囲のものである。重合体組成はポリアミド系、ポリエステル系、ポリウレタン系、ビニル化合物の重合体等、多孔性構造をとりうる公知の重合体を用いることができるが、特に親水性モノマーにより親水化したビニル化合物系多孔性重合体粒子が好ましい結果を与える。

該多孔性構造は、平均孔径 300\AA ないし 9000\AA の範囲にあるのが好ましいが、平均孔径が小さすぎる場合には、吸着される糖含有化合物の量が少なく、大きすぎる場合には、重合体粒子の強度が低下し、かつ表面積が減少するため実用的ではない。

平均孔径の測定は水銀圧入式ポロシメーターによつた。この方法は、多孔性物質に水銀を圧入してゆき、浸入した水銀量から気孔量を、圧入に要する圧力から孔径を求める方法であり、 40\AA 以上の孔を測定することができる。本発明の孔とは、

孔径が 40\AA 以上の表面からの透過孔と定義する。平均孔径は、孔径を r 、ポロシメーターで測定した累積気孔量を V としたとき、 $dV/d\log r$ の値が最大となるときの r の値とする。

担体素材としては、水酸基を有する共重合体が好ましい結果を与え、ビニルアルコール単位を主構成成分とする共重合体が担体として極めて好結果を与える。ビニルアルコール単位を主構成成分とする架橋共重合体からなる担体は、その親水性のため、血漿中のタンパク質等溶質との相互作用が小さく、非特異吸着を最小限に低下させる。また血漿中の補体系、凝固系との相互作用が小さい等の極めて優れた特性を有する。物理的特性の面でも、耐熱性を有し、熱凝固を可能ならしめ、さらには合成高分子の特性である物理的機械的強度に優れている。

ペプチドを不溶性担体表面に固定する方法は、共有結合、イオン結合、物理吸着、包埋あるいは重合体表面への沈殿不溶化等あらゆる公知の方法を用いることができるが、溶出性から考えると、

共有結合により、固定、不溶化して用いることが好ましい。そのため通常固定化酵素、アフィニティクロマトグラフィーで用いられる公知の不溶性担体の活性化方法および結合方法を用いることができる。また、必要に応じて不溶性担体とペプチドの間に任意の長さの分子（スプーサー）を導入して使用することもできる。例えば、アガロースのヒドロキシル基とヘキサメチレンジイソシアナートの片側のイソシアナート基を反応、結合させ、残ったイソシアナート基とペプチドのアミノ基、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基、カルボキシル基等を反応、結合させるごとく実施することができる。

本発明で担体に結合しているペプチドの量は、担体 1ml 当り $1\sim 100\mu\text{mol}$ の範囲が好ましい。保持量が $1\mu\text{mol}/\text{ml}$ 以下では、糖含有物質の吸着量が極端に低下し、また、 $100\mu\text{mol}/\text{ml}$ 以上では、保持されるペプチドどうしの立体障害が生じるため吸着能が低下する場合がある。

以上、本発明に用いる吸着材の製造方法として、

担体を活性化し、糖鎖とアフィニティーを有するペプチドを結合する方法について説明したが、本発明は、これに限定されるものではない。例えば、重合性モノマーまたは架橋剤にペプチドを結合後、重合（共重合）する方法、後架橋時にペプチドを結合した架橋剤を用いる方法等も用いることができる。さらに、不溶性物質にペプチドを結合可能なポリマーをコート後、ペプチドを結合する方法や、ポリマーにペプチドを結合後、不溶性物質にコートする方法も用いることができる。その際、必要に応じてコートポリマーを後架橋することもできる。また、ペプチドを活性化した後担体と結合する方法も採用することができる。

すなわち、本発明は、吸着材中に糖鎖を認識するペプチドが結合していれば、その効果を発揮するものであり、製造方法に左右されるものでないことはいうまでもない。

本発明の糖含有物質の吸着装置は、上述のような糖含有物質の吸着材を、体液の導出入口を備えた容器内に充填保持させてなるものである。

離器を使用して、血漿成分と血球成分とに分離した後、血漿成分を該装置に通過させ、浄化した後、血球成分と合わせて体内にもどす方法であり、他の一つは、体内から取り出した血液を直接該装置に通過させ、浄化する方法である。

体液の過渡方法としては、臨床上の必要に応じて、あるいは設備の装置状況に応じて、連続的に過渡してもよいし、また、断続的に過渡使用してもよい。

本発明の吸着材および吸着装置は、以上述べてきたように、体液中の糖含有物質を高率かつ選択的に吸着除去し、非常にコンパクトであると共に簡便かつ安全である。また、装置操作も容易かつ確実に実施できるというメリットも併せもっている。

本発明は、自己血液、自己血漿等の体液を浄化、再生する一般的な用法に適用可能であり、急性および慢性の炎症、生体免疫機能に関係した疾患の安全で確実な治療、特に悪性腫瘍、膠原病、自己免疫疾患、血液疾患等の治療および生体に害を及

図面において、1は本発明の糖含有物質の吸着装置の1例を示すものであり、円筒2の一端開口部に、内側にフィルター3を張ったパッキング4を介して体液導入口5を有するキャップ6をネジ嵌合し、円筒2の他端開口部に内側にフィルター3'を張ったパッキング4'を介して体液導出口7を有するキャップ8をネジ嵌合して容器を形成し、フィルター3および3'の間に吸着材を充填保持させて吸着材層9を形成してなるものである。

吸着材層9には、本発明の該吸着材を単独で充填してもよく、他の吸着材と混合もしくは積層してもよい。他の吸着材としては、例えば、幅広い吸着能を有する活性炭等を用いることができる。これにより、吸着材の相乗効果によるより広範な臨床効果が期待できる。吸着材層9の容積は、体外循環に用いる場合、50～400 ml程度が適当である。

本発明の装置を体外循環で用いる場合には、大略次の二通りの方法がある。一つには、体内から取り出した血液を遠心分離機もしくは膜型血漿分

離器を使用して、血漿成分と血球成分とに分離した後、血漿成分を該装置に通過させ、浄化した後、血球成分と合わせて体内にもどす方法であり、他の一つは、体内から取り出した血液を直接該装置に通過させ、浄化する方法である。

実施例1

糖鎖認識ペプチドとして、チロシル-プロリル-アスパラギニル-トレオニル-アスパラギン酸 (Tyr-Pro-Asn-Thr-Asp) を使用した。

ペプチドの合成は、ジシクロヘキシルカルボジイミド法 (DCC法) と活性エステル法の組合せにより、C末端よりステップ・ワイズに行なつた後、常法により保護基を除去した。

このようにして得たペプチド Tyr-Pro-Asn-Thr-Asp は、Con A-セファロース 4B と糖タンパク質 (α_1 -アンチトリプシン) の吸着を阻害した。

糖鎖とアフィニティーを有するペプチド固定化吸着材は、次のようにして得た。すなわち、CNBr 活性化セファロース 4B (スウェーデン、ファルマシア社製) に通常の方法によつて、上記ペプチドを固定化し、吸着材を調製した。保持量は $15 \mu\text{mol}/\text{ml}$ セファロースであつた。該吸着材 1 ml と胃癌患者より得た血清 3 ml を 3 角フラスコに入

れ、37℃、2時間振とうし、吸着前後の血清を測定に供した。 α_1 -アンチ・トリブシン(糖タンパク質)は免疫拡散法、アルブミン、総タンパク質は各々BCG法、ビュレット法にて測定した。吸着前の α_1 -アンチ・トリブシンが252mg/dlであつたのに対し、吸着後180mg/dlに低下した。アルブミン、総タンパク質は前値2.4g/dl、5.3g/dlであつたのが、吸着後各々2.3g/dl、5.0g/dlであり、ほとんど低下しなかつた。

比較例1

固定化するペプチドとして、グリシル-グリシル-グリシンを使用した以外は、実施例1と同様に分析した。吸着前の α_1 -アンチ・トリブシンが252mg/dlであつたのに対し、吸着後は230mg/dlとなり、ほとんど低下しなかつた。アルブミン、総タンパク質も吸着前、各々2.4g/dl、5.3g/dlが、吸着後、各々2.3g/dl、5.0g/dlとなり、ほとんど低下しなかつた。

実施例2

糖鎖認識ペプチドは次のようにして得た。すな

したところ、吸着前の α_1 -アシッドグリコプロテイン96mg/dlが、吸着後58mg/dlに低下した。アルブミン、総タンパク質は前値2.4g/dl、5.3g/dlであつたが、吸着後各々2.3g/dl、5.0g/dlとなり、ほとんど低下しなかつた。

実施例3

糖鎖認識ペプチドとして、リジル-トレオニル-セリル-グルタミン-トレオニン(Lys-Thr-Ser-Gln-Thr)をポリビニル系多孔性ゲルToyo Pearl HW60c(東洋曹達工業株式会社製)にエポキシ活性化法によつて固定し、糖鎖認識吸着材を得た。

このペプチドはDCC法と活性エステル法の組合せにより合成した後、常法にしたがい保護基を除去して得た。また、エポキシ活性化ゲルのエポキシ密度は120 μ mol/mlゲルであり、この活性化ゲルに、常法により糖鎖認識ペプチドを固定し、未反応のエポキシドをエタノールアミンを用いてブロックした。保持量は40 μ mol/mlゲルであつた。

うち、糖との結合に関与する側鎖に水素結合供与基および水素結合受容基を有するアミノ酸を原料として、フェニルアラニル-セリル-トレオニル-セリル-トレオニル-リジン(Phe-Ser-Thr-Ser-Thr-Lys)を得た。このペプチドの合成は、DCC法と活性エステル法の組合せにより、C末端よりステップ・ワイズに行なつた後、常法により保護基を除去した。

このようにして得たペプチドPhe-Ser-Thr-Ser-Thr-Lysは、Con A-セファロース4Bと糖タンパク質(α_1 -アシッドグリコプロテイン)の吸着を阻害した。

糖鎖とアフィニティーを有するペプチド固定化吸着材は、粒径120ミクロン、孔径550Åの多孔性ガラスビーズを γ -アミノプロピルトリエトキシシランと反応させてアルキルアミノガラスを得、グルタルアルデヒド法により結合させた。保持量は20 μ mol/mlであつた。該吸着材1mlと胃癌患者より得た血清3mlを三角フラスコに入れ、2時間振とうし、吸着前後の血清を測定に供

した。該吸着材1mlと胃癌患者より得た血清3mlを、実施例1と同様に吸着実験をし、吸着前後の血清を測定に供した。 α_2 -マクログロブリン(糖タンパク質)は免疫拡散法、アルブミン、総タンパク質は各々BCG法、ビュレット法にて測定した。吸着前の α_2 -マクログロブリンが180mg/dlであつたのに対し、吸着後120mg/dlに低下した。アルブミン、総タンパク質は、吸着前後でほとんど変化しなかつた。

実施例4

糖鎖認識ペプチドとして、アラニル-プロリル-トレオニル-セリル-セリル-セリル-トレオニル-リジル-リジル-トレオニン(Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-Lys-Thr)を合成した。合成はDCC-HOBt法(ジシクロヘキシルカルボジイミド-1オキシベンゾトリアゾール法)により、 z -Ala-Pro-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser-OMe……(1)とBoc-Thr(Bzl)-Lys(2)-Lys(2)-Thr(Bzl)-OBzl……(2)を得た後、(1)のC末端保護基と(2)のN末端保護基を除去して、DCC-

HOBt 法によりフラグメント結合をした。得られた保護基を有するデカ・ペプチドの脱保護反応は、常法にしたがい H_2/Pd 法で行なつた。

このデカ・ペプチドを、粒径120ミクロン、孔径500 Åの多孔性ガラスビーズをγ-アミノプロピルトリエトキシシランと反応させてアルキルアミノガラスとした後、カルボジイミド法により固定化し、糖鎖認識吸着材とした。保持量は30 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ガラスビーズであつた。該吸着材1 mlと胃癌患者より得た血清3 mlを三角フラスコに入れ、37℃、2時間振とうし、吸着前後の血清を測定に供した。吸着前のカルシノエムブリオニックアンティゲン(CEA)が12.0 ng/mlであつたのに対し、吸着後5.0 ng/mlに低下した。アルブミン、総タンパク質は、吸着前後でほとんど変化しなかつた。CEAの測定はラジオ・イムノアッセイ(RIA)により、アルブミン、総タンパク質は各々BCG法、ビュレット法により測定した。

4 図面の簡単な説明

図面は本発明の糖含有物質の吸着装置の1例を示す断面図である。

- 1……糖含有物質の吸着装置 2……円筒
3, 3'……フィルター 4, 4'……パッキング
5……体液導入口 6……キャップ
7……体液導出口 8……キャップ
9……吸着材

代理人 清水

